



PCT/FR 2004/002424

REC'D 10 DEC 2004

WIPO

PCT

# BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

BEST AVAILABLE COPY

## COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 27 SEP. 2004

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle  
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

DOCUMENT DE  
PRIORITÉ

PRÉSENTÉ OU TRANSMIS  
CONFORMÉMENT À LA RÈGLE  
17.1. a) OU b)

INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE

SIEGE  
26 bis, rue de Saint-Petersbourg  
75800 PARIS cedex 08  
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04  
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23  
www.inpi.fr



26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

# BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



## REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

page 1/2



Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 540 e W / 210502

<b>REMISE EN DÉPÔT</b> <b>DATE</b> 26 SEPT 2003 <b>LIEU</b> 75 INPI PARIS <b>N° D'ENREGISTREMENT</b> 0311325 <b>NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI</b> <b>DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE PAR L'INPI</b> 26 SEP. 2003		<b>NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE</b> BECKER ET ASSOCIES 35 rue des Mathurins 75008 PARIS	
<b>Vos références pour ce dossier (facultatif)</b> B0231FR			
<b>Confirmation d'un dépôt par télécopie</b>		<input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie	
<b>2 NATURE DE LA DEMANDE</b>		<b>Cochez l'une des 4 cases suivantes</b>	
Demande de brevet		<input checked="" type="checkbox"/>	
Demande de certificat d'utilité		<input type="checkbox"/>	
Demande divisionnaire		<input type="checkbox"/>	
Demande de brevet initiale		N° _____ Date _____	
ou demande de certificat d'utilité initiale		N° _____ Date _____	
Transformation d'une demande de brevet européen		<input type="checkbox"/>	
Demande de brevet initiale		N° _____ Date _____	
<b>3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)</b> Composés promoteurs de la différenciation des précurseurs d'oligodendrocytes et modulateurs de l'activation microgliale, compositions et utilisations.			
<b>4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE</b>		Pays ou organisation _____ N° _____ Date _____ Pays ou organisation _____ N° _____ Date _____ Pays ou organisation _____ N° _____ <input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
<b>5 DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)</b>		<input checked="" type="checkbox"/> Personne morale <input type="checkbox"/> Personne physique	
Nom ou dénomination sociale		UNIVERSITE LOUIS PASTEUR	
Prénoms		Etablissement public	
Forme juridique		_____	
N° SIREN		_____	
Code APE-NAF		4 rue Blaise Pascal	
Domicile ou siège		Rue _____	
Code postal et ville		16 17 00 00 Strasbourg	
Pays		France	
Nationalité		Française	
N° de téléphone (facultatif)		N° de télécopie (facultatif) _____	
Adresse électronique (facultatif)		_____	
<input checked="" type="checkbox"/> S'il y a plus d'un demandeur, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»			

Remplir impérativement la 2<sup>ème</sup> page

REMISE DES PIÈCES  
DATE **20 SEPT 2003**  
LIEU **75 INPI PARIS**  
N° D'ENREGISTREMENT **0311325**  
NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI

DB 540 W / 210502

<b>6 MANDATAIRE (s'il y a lieu)</b>		<b>TEZIER HERMAN</b>	
Nom		Béatrice	
Prénom		BECKER ET ASSOCIES	
Cabinet ou Société			
N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel		00-10000	
Adresse	Rue	35 rue des Mathurins	
	Code postal et ville	[7 5 0 0 8] Paris	
	Pays		
N° de téléphone (facultatif)		01 53 43 85 00	
N° de télécopie (facultatif)		01 53 43 85 05	
Adresse électronique (facultatif)		becker@becker.fr	
<b>7 INVENTEUR (S)</b>		<b>Les inventeurs sont nécessairement des personnes physiques</b>	
Les demandeurs et les inventeurs sont les mêmes personnes		<input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non : Dans ce cas remplir le formulaire de Désignation d'inventeur(s)	
<b>8 RAPPORT DE RECHERCHE</b>		<b>Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation)</b>	
Établissement immédiat ou établissement différé		<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
Paiement échelonné de la redevance (en deux versements)		<b>Uniquement pour les personnes physiques effectuant elles-mêmes leur propre dépôt</b> <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non	
<b>9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES</b>		<b>Uniquement pour les personnes physiques</b> <input type="checkbox"/> Requête pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition) <input type="checkbox"/> Obtenue antérieurement à ce dépôt pour cette invention (joindre une copie de la décision d'admission à l'assistance gratuite ou indiquer sa référence) : AG [ ] [ ] [ ] [ ]	
<b>10 SÉQUENCES DE NUCLEOTIDES ET/OU D'ACIDES AMINÉS</b>		<input type="checkbox"/> Cochez la case si la description contient une liste de séquences	
Le support électronique de données est joint		<input type="checkbox"/>	
La déclaration de conformité de la liste de séquences sur support papier avec le support électronique de données est jointe		<input type="checkbox"/>	
Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes		1	
<b>11 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)</b> Béatrice TEZIER HERMAN CPI 00-10000		<b>VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI</b> 	



26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08  
Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

**BREVET D'INVENTION**  
**CERTIFICAT D'UTILITÉ**  
Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



**REQUÊTE EN DÉLIVRANCE**

Page suite N° 1.../1...



REMISE EN DÉLIVRANCE	Réservé à l'INPI
DATE	20 SEPT 2003
LIEU	75 INPI PARIS
N° D'ENREGISTREMENT	0311325
NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI	

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 829 @ W / 010702

<b>Vos références pour ce dossier (facultatif)</b>		B0231FR																														
<b>4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE</b>		Pays ou organisation Date <table border="1"><tr><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr></table> N° Pays ou organisation Date <table border="1"><tr><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr></table> N° Pays ou organisation Date <table border="1"><tr><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr></table> N°																														
<b>5 DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)</b>		<input checked="" type="checkbox"/> <b>Personne morale</b> <input type="checkbox"/> <b>Personne physique</b>																														
Nom ou dénomination sociale		CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE																														
Prénoms																																
Forme juridique		Etablissement public à caractère scientifique et technologique																														
N° SIREN		<table border="1"><tr><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr></table>																														
Code APE-NAF		<table border="1"><tr><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr></table>																														
Domicile ou siège	Rue	3 rue Michel Ange																														
	Code postal et ville	17 517 914 Paris Cedex 16																														
	Pays	France																														
Nationalité		Française																														
N° de téléphone (facultatif)																																
N° de télécopie (facultatif)																																
Adresse électronique (facultatif)																																
<b>5 DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)</b>		<input checked="" type="checkbox"/> <b>Personne morale</b> <input type="checkbox"/> <b>Personne physique</b>																														
Nom ou dénomination sociale		CENTRE UNIVERSITAIRE DE LUXEMBOURG																														
Prénoms																																
Forme juridique		Etablissement public																														
N° SIREN		<table border="1"><tr><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr></table>																														
Code APE-NAF		<table border="1"><tr><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr></table>																														
Domicile ou siège	Rue	162a avenue de la Faïencerie																														
	Code postal et ville	1 511 Luxembourg - Limpertsberg																														
	Pays	Grand Duché de Luxembourg																														
Nationalité		Luxembourgeois																														
N° de téléphone (facultatif)																																
N° de télécopie (facultatif)																																
Adresse électronique (facultatif)																																
<b>6 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)</b>		<b>VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI</b>																														
Béatrice TEZIER HERMAN CPI 00-10000 																																

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire.  
Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI

# COMPOSES PROMOTEURS DE LA DIFFERENCIATION DES PRECURSEURS D'OLIGODENDROCYTES ET MODULATEURS DE L'ACTIVATION MICROGLIALE, COMPOSITIONS ET UTILISATIONS.

- 5 La présente invention a pour objet tout composé isolé ou synthétique, et en particulier les composés de formule (I), provoquant la différenciation de cellules souches neurales et/ou de cellules précurseurs d'oligodendrocytes en cellules oligodendrogiales. Elle concerne également les compositions les comprenant ainsi que les méthodes de préparation de tels composés et l'utilisation desdits composés dans le cadre de la préparation d'une
- 10 composition pharmaceutique destinée à la prévention ou au traitement de maladies affectant le système nerveux.

Le neurone, cellule hyper spécialisée, se développe au sein d'un tissu de soutien et d'environnement, la glie. La glie centrale est composée des cellules gliales du système

15 nerveux central et, la glie périphérique, des cellules gliales du système nerveux périphérique. Plus précisément, la glie centrale comprend les astrocytes (astroglie), les oligodendrocytes (oligodendroglie) et les microgliocytes (microglie). La glie périphérique comprend quant à elle les cellules de Schwann, équivalent des oligodendrocytes de la glie centrale.

- 20 Les astrocytes sont des constituants de la barrière hématoencéphalique (BHE). Ils interviennent dans la régulation du métabolisme cérébral et servent d'interface entre les capillaires et les neurones (rôle nutritif) par l'intermédiaire de prolongements (pseudopodes) qui s'enroulent autour des capillaires. Ils participent à la recapture des neurotransmetteurs et interviennent également dans la cicatrisation en produisant des
- 25 filaments gliaux (similaires aux neurofilaments).

Les microgliocytes sont des cellules gliales originaires de la lignée myéloïde envahissant le système nerveux central pendant la période embryonnaire. Elle peuvent être activées par une lésion et participent au processus de cicatrisation.

- Les oligodendrocytes sont plus particulièrement étudiés en recherche biomédicale dans la
- 30 mesure où ils assurent la formation de la myéline dans le système nerveux central. Il existe une diversité de progéniteurs à l'origine des oligodendrocytes. Ces cellules sont générées dans des foyers ventriculaires très restreints tout au long du tube neural. Chez l'adulte les

oligodendrocytes sont dispersés dans tout le parenchyme cérébral, avec une prédominance dans les faisceaux de substance blanche.

La gaine de myéline, synthétisée par l'oligodendrocyte, est un complexe protéinique membranaire qui s'enroule autour des axones. Elle possède une double fonction: elle joue un rôle d'isolant électrique et surtout elle permet d'augmenter la vitesse de propagation de l'influx nerveux. Une atteinte de cette gaine conduira à un ralentissement, voire un arrêt du potentiel d'action, perturbant la transmission nerveuse de l'information et provoquant des troubles neurologiques. La perte ou le mauvais état de la myéline entraîne l'apparition de maladies dites démyélinisantes ou dysmyélinisantes. La plus répandue et la plus dévastatrice de ces maladies est la sclérose en plaques (SEP).

La sclérose en plaques est une maladie neurologique du jeune adulte qui associe une démyélinisation à des éléments inflammatoires. Les traitements actuels prennent relativement bien en compte la composante inflammatoire. Cependant ils s'avèrent inopérants sur la composante démyélinisation, cause du handicap permanent et cumulatif. Contrairement à ce que l'on pensait autrefois, il s'avère que, même au début de la maladie, les oligodendrocytes gardent la potentialité de fabriquer de la nouvelle myéline (remyélinisation). Par contre, au stade chronique, cette capacité de remyélinisation semble bien perdue. On sait ainsi que chez la plupart des malades, la SEP évolue d'abord sous la forme à "poussées et rémissions", ensuite sous la forme "progressive". Il semble bien que les oligodendrocytes et leurs précurseurs peuvent survivre aux phénomènes inflammatoires de la première phase, mais que par contre leur nombre et leur efficacité sont considérablement réduits pendant la phase chronique. Deux possibilités thérapeutiques étaient jusque là envisagées : la transplantation d'oligodendrocytes (greffe) ou une stimulation de la myélinisation par des substances chimiques à partir des oligodendrocytes survivants (remyélinisation endogène).

En ce qui concerne la transplantation, l'utilisation des précurseurs des oligodendrocytes (cellules jeunes peu différenciées) considérés comme ayant de plus grandes possibilités de synthèse de myéline et de migration que les oligodendrocytes adultes, est envisagée dans l'art antérieur pour permettre la réparation d'un volume maximum de zones démyélinisées. La source idéale d'oligodendrocytes serait du tissu nerveux humain très

jeune (embryonnaire) ce qui soulève des problèmes pratiques et éthiques. On ignore d'autre part quelles seront leurs propriétés migratoires. Or, le problème est que, chez la plupart des patients, les lésions sont multiples et qu'il est illusoire de les " greffer " chacune individuellement. On ne sait en outre toujours pas si ces oligodendrocytes sont  
 5 capables de migrer par eux-mêmes ou si l'intervention de facteurs chimiques spécifiques est indispensable, de même que l'on ignore la longévité de ces cellules.

On a par ailleurs décrit, dans l'art antérieur, différentes substances peptidiques identifiées ci-dessus sous le nom de facteurs neurotrophiques (Recent progress in the studies of  
 10 neurotrophic factors and their clinical implications, L. Shen, A. Figurov & B. Lu, Journal of Molecular Medicine, 1997, vol. 75, 637-644). Ce sont les facteurs de croissance spécifiques du cerveau. Ils protègent les cellules nerveuses contre diverses agressions, en particulier contre les substances libérées par les cellules microgliales activées et responsables de l'inflammation du cerveau ainsi que vis-à-vis de diverses maladies dues  
 15 au mauvais fonctionnement du système nerveux. En règle générale, ces facteurs neurotrophiques augmentent la survie des cellules nerveuses, favorisent leur différenciation c'est-à-dire leur maturation, et les rendent fonctionnelles.

Les inventeurs se sont, dans le cadre de la présente invention, penchés sur les actions  
 20 possibles de ces facteurs sur les cellules dites souches (Stem cells-Clinical application and Perspectives. M. Brehm, T. Zeus & B. E. Strauer, Herz, 2002, vol.27, 611-620). En effet, de récentes découvertes laissent entrevoir qu'un important chapitre est en train de s'ouvrir en biomédecine. Ces cellules souches pourraient être des outils indispensables pour une nouvelle branche de la médecine connue sous le nom de médecine régénératrice [(Stem  
 25 cells for regenerative medicine : advances in the engineering of tissues and organs, J. Ringe, C. Kaps, G.R. Burmester & M. Sittinger, 2002, vol.89, 338-351) (Regenerating the damaged central nervous system, P.J. Horner & F.H. Gage, Nature, 2000, vol ; 407, 963-970)]. Cette médecine trouverait de puissantes applications dans le traitement des maladies liées à la vieillesse, des maladies neurodégénératives (Human stem cells as targets for the  
 30 aging and diseases of aging processes, Medical Hypotheses, 2003, vol. 60, N° 3, 439-447) et des affections du système nerveux post traumatiques.

Initialement, les cellules souches sont d'origine embryonnaire. Elles sont ainsi essentiellement présentes chez les fœtus et les enfants en bas âge. Elles sont capables de se multiplier quasiment à l'infini. Sous l'action de ces facteurs neurotrophiques, elles se transforment en cellules matures et fonctionnelles de différents types (Neurons and astrocytes secrete factors that cause stem cells to differentiate into neurons and astrocytes, respectively, M.Y. Chang, H. Son, Y.S. Lee & S.H. Lee, Molecular and Cellular Neuroscience 2003, vol.23 N°3, 414-426). Très récemment, il a été démontré que les cellules souches sont aussi présentes dans des organes de stades plus développés, en particulier dans le cerveau (Adult Neurogenesis and Neural Stem Cells of the Central Nervous System in Mammals, Ph. Taupin & F.H. Gage, Journal of Neuroscience Research, 2002, vol. 69, 745-749) et la moelle épinière des adultes. Ainsi donc, sous l'action de différents facteurs de croissance, les cellules souches neurales c'est-à-dire les cellules souches présentes dans le cerveau des personnes âgées, peuvent se transformer en neurones, en astrocytes ou en oligodendrocytes, et probablement aussi en microglie, c'est-à-dire les principaux types de cellules nerveuses décrites ci-dessus qui conditionnent le bon fonctionnement du cerveau.

Cependant à cause de leur taille moléculaire et de leurs propriétés physicochimiques, ces facteurs de croissance naturels et protéiques ne peuvent traverser diverses barrières biologiques, en particulier la barrière hématoencéphalique. Ils ne peuvent donc pas pénétrer dans le cerveau en quantités suffisantes pour exercer leurs actions bénéfiques. En outre, ils présentent une très mauvaise biodisponibilité, limitant ainsi leur efficacité et leur utilisation.

L'invention propose à présent une alternative avantageuse à la transplantation qui consiste en l'utilisation de nouveaux composés. Ces derniers sont capables de franchir la barrière hématoencéphalique et de favoriser une remyélinisation « endogène » en permettant la différenciation des cellules souches neurales et/ou des précurseurs d'oligodendrocytes en oligodendrocytes. La présente invention décrit en effet la mise au point de petites molécules hydrophobes capables d'une part de pénétrer dans le cerveau en quantité suffisante pour promouvoir un effet biologique recherché et d'autre part, de mimer l'action de certains facteurs neurotrophiques. Ces mimes sont en mesure de transformer des cellules souches neurales en cellules nerveuses différenciées de même que des précurseurs d'oligodendrocytes en oligodendrocytes et ceci, in situ, dans le cerveau.



Cette alternative permet ainsi d'éviter l'étape risquée de l'opération chirurgicale. En effet, lorsque des cellules souches sont utilisées pour le traitement des maladies neurodégénératives, ces dernières sont introduites dans le cerveau à l'aide d'une opération chirurgicale (Neural stem cells in the developing central nervous system : implications for cell therapy through transplantation, C.N. Svendsen & M.A. Caldwell, Progress in Brain Research, 2000, vol. 127, 13-34) tout comme peuvent l'être les précurseurs des oligodendrocytes.

Les inventeurs ont ainsi mis au point et synthétisé des composés capables d'inhiber l'inflammation du système nerveux et d'induire en outre la différenciation des cellules souches et/ou des cellules précurseurs d'oligodendrocytes en oligodendrocytes matures.

Un premier objet de l'invention concerne ainsi tout composé isolé ou synthétique provoquant la différenciation de cellules souches, en particulier neurales, et/ou de cellules précurseurs d'oligodendrocytes en cellules oligodendrogiales et/ou réprimant l'activation des cellules microgliales.

De manière préférée, l'invention concerne tout composé isolé ou synthétique provoquant, in vivo ou ex vivo, la différenciation de cellules souches, en particulier neurales, et/ou de cellules précurseurs d'oligodendrocytes en cellules oligodendrogiales, et/ou réprimant in vivo l'activation des cellules microgliales. Il concerne également l'utilisation d'un tel composé in vivo pour moduler, de préférence réprimer l'activation des cellules microgliales, à l'instar des composés anti-inflammatoires non-stéroïdiens (NSAIDs), ces derniers n'ayant toutefois pas, au contraire des composés ou compositions selon l'invention, la capacité de franchir la barrière hématoencéphalique.

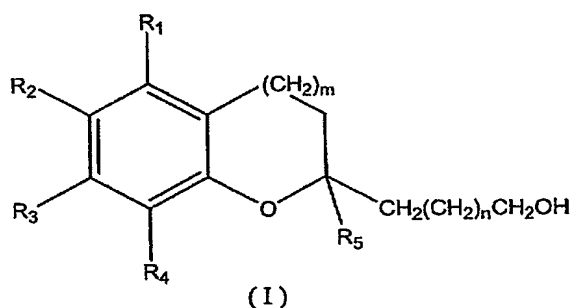
Les composés selon l'invention sont d'excellents agents pour le traitement des maladies neurodégénératives, démyélinisantes ou dysmyélinisantes, telles que notamment la sclérose en plaques, la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, la maladie de Creutzfeldt-Jakob mais également les démences vasculaires, la sclérose latérale amyotrophiques, les amyotrophies spinales infantiles et les maladies neurodégénératives liées aux accidents vasculaires cérébraux. L'invention concerne également leurs procédés de préparation et les compositions pharmaceutiques les contenant.

La présente invention a pour objet en particulier les alcools hydrocarbonés à chaîne longue, substitués par un noyau de type tocophérol, ainsi que leurs analogues. Ces composés sont nommés Tocopherol Fatty Alcohols (TFA).

- 5 Les composés selon l'invention comprennent de façon préférée une longue chaîne de  $\omega$ -alcanol et un noyau de type tocophérol. Avec une longueur de chaîne de taille appropriée et des substituants convenablement choisis, de tels composés sont capables de réprimer l'activation des cellules microgliales et de transformer les cellules souches neurales en cellules oligodendrocytaires matures. Comme expliqué ci-dessus, ces deux caractéristiques
- 10 sont essentielles pour le traitement des maladies neurodégénératives ou de type démyélinisante ou dysmyélinisante comme la sclérose en plaques.

Un objet particulier de l'invention concerne ainsi des composés représentés par la formule (I) générale suivante :

15



dans laquelle

- $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  et  $R_4$ , identiques ou différents, représentent un atome d'hydrogène, un groupe hydroxyle, un groupe ( $C_1$ - $C_6$ ) alkyle, linéaire ou ramifié, un groupe ( $C_1$ - $C_6$ ) alkoxy linéaire ou ramifié, un groupe ( $C_1$ - $C_6$ ) carboxylate, linéaire ou ramifié,
- $R_5$  représente un atome d'hydrogène ou un groupe ( $C_1$ - $C_6$ ) alkyle linéaire ou ramifié,
- $m$  est un nombre entier compris entre 0 et 2, et
- $n$  est un nombre entier compris entre 8 et 25, de préférence entre 8 et 16.

25

La formule (I) est constituée donc d'un noyau aromatique accolé à un cycle à 5, 6 ou 7 chaînons ( $m = 0, 1, 2$ ), c'est-à-dire un benzofurane, un benzopyrane ou l'un de leurs analogues supérieurs. De préférence,  $m$  est égal à 1.

Les composés de formule (I) incluent les composés où l'atome de carbone portant le substituant  $R_5$  est de configuration R, S ou un mélange (de préférence racémique).

- 5 Selon l'invention, le terme "alkyle" désigne un radical hydrocarboné linéaire ou ramifié ayant avantageusement de 1 à 6 atomes de carbone, tel que méthyle, éthyle, propyle, isopropyle, butyle, isobutyle, *tert*-butyle, pentyle, néopentyle, n-hexyle, etc. Lorsqu'au moins un  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  et  $R_4$  représente un radical alkyle, les groupes méthyle, éthyle, isopropyle ou tertibutyle sont préférés.

10

Les groupes « alkoxy » correspondent aux groupes alkyle définis ci-dessus reliés au reste de la molécule par l'intermédiaire d'une liaison -O- (éther). On préfère tout particulièrement les groupes en  $C_1$ - $C_6$ , notamment méthoxy, éthoxy, isopropoxy ou un tert-butoxy.

15

Les groupes « carboxylate » correspondent aux groupes -OCO-alkyle, le terme alkyle étant tel que défini ci-dessus, tels qu'un acétate, un propionate, un butylate, un pentanoate ou un hexanoate.

20

Selon un aspect particulier de l'invention, les composés de formule (I) correspondent à ceux pour lesquels au moins un, de préférence un seul, des substituants présents sur le noyau aromatique,  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  et/ou  $R_4$  représente un groupe hydroxyle, un groupe alkoxy ou carboxylate.

25

Selon un autre aspect particulier de l'invention,  $R_5$  représente un atome d'hydrogène ou un groupe alkyle, de préférence méthyle, avec une configuration R, S ou un mélange (de préférence racémique).

30

La chaîne latérale du composé de formule (I) correspond donc à un  $\omega$ -alcanol dans lequel n est compris entre 8 et 25, de préférence entre 8 et 16. Les composés de formule (I) dans lesquels n est égal à 10, 11, 12, 13, 14, 15 ou 16 sont des composés particulièrement efficaces dans le cadre de la présente invention. Les composés comprenant une chaîne latérale d'au moins 12 atomes de carbone et au plus 18 atomes de carbone, i.e. TFA12,

TFA14, TFA15, TFA16 et TFA18, sont particulièrement préférés. Des composés pouvant être synthétisés par le mode opératoire décrit ci-dessous possèdent ainsi de bonnes activités biologiques comme les composés où  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  et/ou  $R_4$  sont des groupements méthoxy ou des groupements acétate, la chaîne latérale ayant les mêmes nombres d'atomes de carbones que précédemment décrit.

Un objet de l'invention concerne ainsi une composition pharmaceutique comprenant à titre de substance active au moins un composé isolé ou synthétique capable de provoquer la différenciation de cellules souches neurales et/ou de cellules précurseurs d'oligodendrocytes en cellules oligodendrogiales, ou la modulation de l'activation des cellules microgliales en association avec un véhicule acceptable sur le plan pharmaceutique.

Un autre objet de la présente invention concerne également des compositions pharmaceutiques comprenant à titre de substance active au moins un composé répondant à la formule générale (I) selon l'invention, telle que définie précédemment, en association avec un véhicule ou un excipient acceptable sur le plan pharmaceutique.

Quelle que soit la voie d'administration choisie, des compositions préférées selon l'invention se présentent sous une forme favorable à la protection et à l'assimilation optimale du principe actif.

Les composés ou compositions selon l'invention peuvent être administrés de différentes manières et sous différentes formes. Ainsi, ils peuvent être administrés de manière systémique, par voie orale, par inhalation ou par injection, comme par exemple par voie intraveineuse, intra-musculaire, sous-cutanée, trans-dermique, intra-artérielle, etc., les voies intraveineuse, intra-musculaire, sous-cutanée, orale et par inhalation étant préférées. Pour les injections, les composés sont généralement conditionnés sous forme de suspensions liquides, qui peuvent être injectées au moyen de seringues ou de perfusions, par exemple. A cet égard, les composés sont généralement dissous dans des solutions salines, physiologiques, isotoniques, tamponnées, etc., compatibles avec un usage pharmaceutique et connues de l'homme du métier. Ainsi, les compositions peuvent contenir un ou plusieurs agents ou véhicules choisis parmi les dispersants, solubilisants,

stabilisants, conservateurs, etc. Des agents ou véhicules utilisables dans des formulations liquides et/ou injectables sont notamment la méthylcellulose, l'hydroxyméthylcellulose, la carboxyméthylcellulose, le polysorbate 80, le mannitol, la gélatine, le lactose, des huiles végétales, l'acacia, etc.

- 5 Les composés peuvent également être administrés sous forme de gels, huiles, comprimés, suppositoires, poudres, gélules, capsules, aérosols, etc., éventuellement au moyen de formes galéniques ou de dispositifs assurant une libération prolongée et/ou retardée. Pour ce type de formulation, on utilise avantageusement un agent tel que la cellulose, des carbonates ou des amidons.
- 10 Les composés selon l'invention peuvent en particulier réprimer l'activation des cellules microgliales aux concentrations de  $10^{-5}$ - $10^{-8}$ M, de préférence  $10^{-6}$ . Cette inhibition est en grande partie due à la désaffectation de l'enzyme NO synthase et à la synthèse de TNF-alpha. Ces composés transforment, dans les mêmes conditions préférées de concentrations, les cellules précurseurs d'oligodendrocytes en oligodendrocytes matures.

- 15 Les inventeurs ayant démontré une activité des composés selon l'invention aux concentrations de  $10^{-5}$ - $10^{-8}$  M, il est entendu que le débit et/ou la dose injectée peuvent être adaptés par l'homme du métier en fonction du patient, de la pathologie concernée, du mode d'administration, etc. En outre, des injections répétées peuvent être réalisées, le cas échéant. D'autre part, pour des traitements chroniques, des systèmes retard ou prolongés peuvent être avantageux.
- 20

- L'invention concerne par ailleurs l'utilisation d'un composé dans le cadre de la préparation d'une composition pharmaceutique destinée à la prévention ou au traitement des maladies du système nerveux altérant les oligodendrocytes ou leur activité et/ou de l'inflammation du système nerveux. De telles maladies incluent notamment les maladies neurodégénératives, et en particulier les maladies démyélinisantes ou dysmyélinisantes.
- 25

- Au sens de l'invention, le terme traitement désigne aussi bien un traitement préventif que curatif, qui peut être utilisé seul ou en combinaison avec d'autres agents ou traitements. En outre, il peut s'agir d'un traitement de troubles chroniques ou aigus.
- 30

Ainsi donc les composés TFA tels que décrits ci-dessus, peuvent être utilisés comme agents pharmaceutiques dans le traitement des maladies neurodégénératives et des maladies démyélinisantes, en particulier de la sclérose en plaques.

- 5 Un autre objet de l'invention concerne l'utilisation d'un composé ou d'une composition selon l'invention pour moduler in vivo l'activité des cellules microgliales et/ou des cellules précurseurs d'oligodendrocytes en oligodendrocytes.

- 10 Un autre objet de l'invention concerne l'utilisation d'un composé ou d'une composition selon l'invention pour le traitement, ex vivo, de cellules souches ou de cellules précurseurs d'oligodendrocytes, telles que décrites précédemment. En particulier ce traitement consiste à induire la différenciation desdites cellules.

- 15 L'invention concerne aussi une méthode de traitement préventif ou curatif des maladies du système nerveux altérant les oligodendrocytes ou leur activité et/ou de l'inflammation du système nerveux, comprenant l'administration à un sujet atteint d'une telle pathologie ou présentant un risque d'en développer, d'une quantité efficace d'un composé ou d'une composition selon l'invention, par exemple d'un composé répondant à la formule (I), ou encore de cellules souches ou de cellules précurseurs d'oligodendrocytes traitées ex vivo,  
20 comme indiqué ci-dessus.

- Des maladies susceptibles d'être traitées à l'aide d'un composé selon l'invention sont en particulier la sclérose en plaques, la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, la maladie de Creutzfeldt-Jakob. D'autres maladies susceptibles d'être traitées sont les  
25 démences vasculaires, la sclérose latérale amyotrophique, les amyotrophies spinales infantiles et les maladies neurodégénératives dérivées d'accidents vasculaires cérébraux.

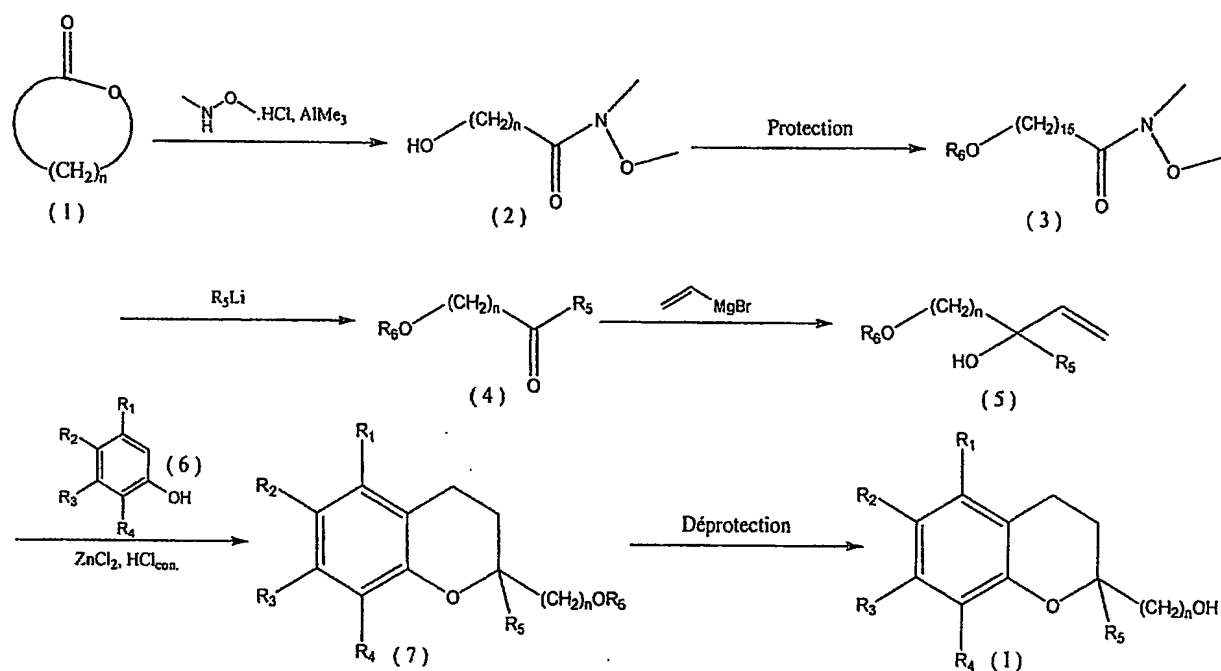
- Les composés de l'invention peuvent être préparés à partir de produits du commerce, en mettant en œuvre une combinaison de réactions chimiques connues de l'homme du métier,  
30 éventuellement à la lueur du procédé de préparation des composés de formule générale (I) tel que décrit ci-dessous.

Les composés de formule générale (I) peuvent être notamment obtenus par un procédé de préparation comprenant les étapes suivantes :

une formation d'un amide de Weinreb, une addition-élimination, une addition d'un magnésien et un couplage catalysé par  $\text{ZnCl}_2$  et  $\text{HCl}$ .

5

Un composé de formule (I) selon l'invention peut, par exemple, être préparé selon le schéma réactionnel particulier suivant :



10

dans lequel :

- $\text{R}_1, \text{R}_2, \text{R}_3, \text{R}_4, \text{R}_5$  et  $n$  ont la même signification que décrite précédemment.
- $\text{R}_6$  représente un groupement benzyle ou un groupement *tert*-butyldiméthylsilyle.

15

Plus précisément, le composé (I) est préparé en faisant réagir le composé (1) avec la diméthylhydroxylamine en présence de triméthylaluminium pour obtenir le composé (2) dont la fonction alcool est ensuite protégée pour donner le composé (3). Une addition nucléophile d'un organolithien sur le composé (3) fournit le composé (4) qui, en présence de vinylmagnésien, donne le composé (4). La réaction entre le composé (5) et le composé

20

(6), en présence de chlorure de zinc et d'acide chlorhydrique concentré, fournit le composé (7) qui, par déprotection de la fonction alcool, donne le composé (I).

Plus précisément, le composé (I) où  $R_1$ ,  $R_3$ ,  $R_4$  et  $R_5$  sont des groupements méthyles,  $R_2$  est un groupement hydroxyle,  $m = 1$  et  $n = 1$  peut être préparé de la façon suivante :

De l'oxacycloheptadécane-2-one réagit avec de la diméthylhydroxylamine en présence de triméthylaluminium à  $0^\circ\text{C}$  et à pression atmosphérique pour donner du 16-hydroxy-hexadécane-méthoxy-méthyl-amide. La fonction alcool de ce composé est ensuite protégée en présence d'hydruure de sodium et de bromure de benzyle à  $78^\circ\text{C}$  et à pression atmosphérique. Le 16-benzyloxy-hexadécane-méthoxy-méthyl-amide ainsi obtenu, est ensuite transformé par action du méthyllithium en 17-benzyloxy-heptadécane-2-one à  $78^\circ\text{C}$  et à pression atmosphérique. Ce dernier réagit avec du vinylmagnésien pour donner le 18-benzyloxy-3-méthyl-octadéc-1-ène-3-ol qui en présence de triméthylhydroquinone, de chlorure de zinc et d'acide chlorhydrique concentré, fournit le 2-(15-benzyloxy-pentadécyl)-2,5,7,8-tétraméthyl-chroman-6-ol. Ce composé est finalement soumis à une hydrogénation catalytique en présence de palladium sur charbon pour donner le 2-(15-hydroxy-pentadécyl)-2,5,7,8-tétraméthyl-chroman-6-ol.

L'invention concerne par ailleurs des outils et kits destinés à la mise en œuvre de l'une ou l'autre des méthodes telles que décrites ci-dessus.

D'autres aspects et avantages de la présente invention apparaîtront à la lecture des exemples qui suivent, fournis à titre illustratif et non limitatif.

## 25 EXEMPLES

### A. Préparation d'un composé de formule (I)

#### 1. Préparation de 16-Hydroxy- hexadécane-méthoxy-méthyl-amide

1,78 g de diméthylhydroxylamine (17,687 mmol ; 3 éq. ;  $\text{PM} = 97,55 \text{ g/mol}$ ) sont dissous dans 10 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  distillé sous argon puis refroidis à  $-78^\circ\text{C}$ . 8,8 mL de  $\text{AlMe}_3$  à 2 M dans l'hexane (17,687 mmol ; 3 éq. ;  $\text{PM} = 72,09 \text{ g/mol}$ ) sont ajoutés goutte à goutte à –



78 °C puis la réaction est laissée sous agitation à température ambiante pendant une demi-heure. La solution est ensuite refroidie à 0 °C et 1,55 g d'oxacycloheptadécan-2-one (5,895 mmol ; 1 éq. ; PM = 254,42 g/mol) dissous dans 5 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> distillé sont ajoutés goutte à goutte. La réaction est laissée sous agitation à température ambiante. Une analyse par chromatographie en couche mince montre que la réaction est terminée après une heure et demie. La solution est versée goutte à goutte dans un mélange de 60 mL de Et<sub>2</sub>O/MeOH 2 : 1 refroidi à -78 °C puis filtrée sur célite. 100 mL d'une solution saturée aqueuse de NaHCO<sub>3</sub> sont ajoutés et la phase aqueuse est extraite à l'éther. Les phases organiques réunies sont séchées par du sulfate de magnésium puis évaporées sous pression réduite pour donner 1,66 g de 16-hydroxy-hexadécan-méthoxy-méthyl-amide, ce qui correspond à 5,262 mmol, et à un rendement de 89 %. L'amide ainsi obtenu sera utilisé sans purification supplémentaire.

R<sub>f</sub> = 0,1 ; éluant : 30 % d'acétate d'éthyle dans l'hexane

15

RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 1,24 (s large, 22H, H-4 à H-14) ; 1,52-1,63 (m, 4H, H-3 et H-15) ; 2,39 (t, 2H, J = 7,7 Hz, H-2) ; 3,16 (s, 3H, H-1') ; 3,61-3,66 (m, 5H, H-16 et H-2')

20

RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 24,6 (CH<sub>2</sub>, C-14) ; 25,7 (CH<sub>2</sub>, C-3), 29,4-29,6 (10 x CH<sub>2</sub>, C-4 à C-13) ; 31,9 (CH<sub>2</sub>, C-2) ; 32,0 (CH<sub>3</sub>, C-1') ; 32,8 (CH<sub>2</sub>, C-15) ; 61,16 (CH<sub>3</sub>, C-2') ; 63,0 (CH<sub>2</sub>, C-16)

## 2. Préparation de 16-Benzoyloxy-hexadécan-méthoxy-méthyl-amide

25

3,27 g de 16-hydroxy-hexadécan-méthoxy-méthyl-amide (10,364 mmol ; 1 éq. ; PM = 315,49 g/mol) sont dissous dans 40 mL de THF distillé sous agitation. 0,83 g de NaH à 60 % dans l'huile (20,729 mmol ; 2 éq. ; PM = 24 g/mol) lavé à l'hexane est ajouté et la solution est chauffée sous reflux (75 °C) pendant une demi-heure. 1,48 mL de BnBr (12,437 mmol ; 1,2 éq. ; PM = 171,04 g/mol) sont ajoutés et la solution est chauffée sous reflux. Une analyse par chromatographie en couche mince montre que la réaction est terminée après 24 heures. 100 mL d'une solution aqueuse saturée de NH<sub>4</sub>Cl sont ajoutés et la phase aqueuse est extraite à l'éther. Les phases organiques réunies sont séchées par du

30

sulfate de magnésium et évaporées sous pression réduite pour donner un brut jaune. Le brut est chromatographié sur colonne de silice (5 x 15 cm, éluant 30 % d'acétate d'éthyle dans l'hexane). Au total, 2,92 g de 16-benzyloxy-hexadécan-méthoxy-méthyl-amide sont récupérés, ce qui correspond à 7,198 mmol et à un rendement de 69,4 %.

5

$R_f = 0,5$  ; éluant : 30 % d'acétate d'éthyle dans l'hexane

**RMN  $^1\text{H}$**  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  : 1,25 (s large, 22H, H-4 à H-14) ; 1,56-1,65 (m, 4H, H-3 et H-15) ; 2,40 (t, 2H,  $J = 7,6$  Hz, H-2) ; 3,17 (s, 3H, H-1'') ; 3,46 (t, 2H,  $J = 6,6$  Hz, H-16) ; 3,67 (s, 3H, H-2'') ; 4,50 (s, 2H, H-17) ; 7,24-7,34 (m, 5H, H-2' à H-6')

10

**RMN  $^{13}\text{C}$**  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  : 24,6 ( $\text{CH}_2$ , C-15) ; 26,2 ( $\text{CH}_2$ , C-3) ; 29,3-29,7 (10 x  $\text{CH}_2$ , C-4 à C-14) ; 31,9 ( $\text{CH}_2$ , C-2) ; 32,1 ( $\text{CH}_3$ , C-1'') ; 61,2 ( $\text{CH}_3$ , C-2'') ; 70,5 ( $\text{CH}_2$ , C-16) ; 72,8 ( $\text{Ph-CH}_2$ , C-17) ; 127,4 ( $\text{Ph}$ , C-4') ; 127,6 ( $\text{Ph}$ , C-2' et C-6') ; 128,3 ( $\text{Ph}$ , C-3' et C-5') ; 138,7 ( $\text{Ph}$ , C-1')

15

### 3. Préparation de 17-Benzyloxy-heptadécan-2-one

0,5 g de 16-benzyloxy-hexadécan-méthoxy-méthyl-amide (1,232 mmol ; 1 éq. ;  $\text{PM} = 405,62$  g/mol) est dissous dans 8 mL de THF distillé sous argon puis refroidi à  $-78^\circ\text{C}$ . 2,46 mL de MeLi à 1,5 M dans l'éther (3,698 mmol ; 3 éq. ;  $\text{PM} = 21,95$  g/mol) sont ajoutés goutte à goutte à  $-78^\circ\text{C}$ . Une analyse par chromatographie en couche mince montre que la réaction est instantanée. 100 mL d'une solution aqueuse saturée de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  sont ajoutés et la phase aqueuse est extraite à l'éther. Les phases organiques réunies sont séchées par du sulfate de magnésium et évaporées sous pression réduite pour donner un brut jaune. Le brut est chromatographié sur colonne de silice (5 x 15 cm, éluant 15 % d'acétate d'éthyle dans l'hexane). Au total, 0,34 g de 17-benzyloxy-heptadécan-2-one est récupéré, ce qui correspond à 0,941 mmol et à un rendement de 76,3 %.

25

$R_f = 0,6$  ; éluant : 30 % d'acétate d'éthyle dans l'hexane

30

RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  : 1,26 (s large, 22H, H-5 à H-15) ; 1,55-1,65 (m, 4H, H-4 et H-16) ; 2,14 (s, 3H, H-1) ; 2,42 (t, 2H,  $J = 7,5$  Hz, H-3) ; 3,47 (t, 2H,  $J = 6,6$  Hz, H-17) ; 4,51 (s, 2H, H-18) ; 7,25-7,36 (m, 5H, H-2' à H-6')

5 RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  : 23,9 ( $\text{CH}_2$ , C-4) ; 26,2-29,8 (13 x  $\text{CH}_2$ , C-1, C-5 à C-16) ; 43,8 ( $\text{CH}_2$ , C-3) ; 70,5 ( $\text{CH}_2$ , C-17) ; 72,8 (Ph- $\text{CH}_2$ , C-18) ; 127,4 (Ph, C-4') ; 127,6 (Ph, C-2' et C-6') ; 128,3 (Ph, C-3' et C-5') ; 138,7 (Ph, C-1') ; 209,4 (C=O)

#### 4. Préparation de 18-Benzyloxy-3-méthyl-octadéc-1-èn-3-ol

10

0,33 g de 17-benzyloxy-heptadécane-2-one (0,915 mmol ; 1 éq. ; PM = 360,6 g/mol) est dissous dans 10 mL de THF distillé sous agitation puis refroidi à 0 °C. 2,75 mL de bromure de vinylmagnésien à 1 M dans le THF (2,745 mmol ; 3 éq. ; PM = g/mol) sont ajoutés goutte à goutte à 0 °C. La solution est laissée sous agitation à température  
15 ambiante. Une analyse par chromatographie en couche mince montre que la réaction est terminée après 3 heures. 100 mL d'une solution aqueuse saturée de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  sont ajoutés et la phase aqueuse est extraite à l'éther. Les phases organiques réunies sont séchées par du sulfate de magnésium et évaporées sous pression réduite pour donner un brut jaune. Le brut est chromatographié sur colonne de silice (4 x 15 cm, éluant 20 % d'acétate d'éthyle  
20 dans l'hexane). Au total, 0,31 g de 18-benzyloxy-3-méthyl-octadéc-1-èn-3-ol est récupéré, ce qui correspond à 0,812 mmol et à un rendement de 88,7 %.

$R_f = 0,7$  ; éluant : 30 % d'acétate d'éthyle dans l'hexane

25 RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  : 1,26 (s, 3H, H-3a) ; 1,27 (s large, 24H, H-5 à H-16) ; 1,54-1,64 (m, 4H, H-4 et H-17) ; 3,47 (t, 2H,  $J = 6,6$  Hz, H-18) ; 4,51 (s, 2H, H-19) ; 5,04 (dd, 1H,  $J_{1a-1b} = 1,2$  Hz,  $J_{1a-2} = 10,6$  Hz,  $H_{1a}$ ) ; 5,20 (dd, 1H,  $J_{1b-1a} = 1,2$  Hz,  $J_{1b-2} = 17,3$  Hz,  $H_{1b}$ ) ; 5,91 (dd, 1H,  $J_{2-1a} = 10,6$  Hz,  $J_{2-1b} = 17,3$  Hz,  $H_{1b}$ ) ; 7,26-7,35 (m, 5H, H-2' à H-6')

30

RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  : 23,9 ( $\text{CH}_2$ , C-5) ; 26,2 ( $\text{CH}_2$ , C-6) ; 27,7 ( $\text{CH}_3$ , C-3a) ; 29,5-30,0 (11 x  $\text{CH}_2$ , C-7 à C-17) ; 42,4 ( $\text{CH}_2$ , C-4) ; 70,5 ( $\text{CH}_2$ , C-18) ; 72,8 (Ph- $\text{CH}_2$ , C-

19) ; 73,3 (C quaternaire, C-3) ; 111,4 (CH<sub>2</sub>, C-1) ; 127,4 (Ph, C-4') ; 127,6 (Ph, C-2' et C-6') ; 128,3 (Ph, C-3' et C-5') ; 138,7 (Ph, C-1') ; 145,3 (CH, C-2)

## 5. Préparation de 2-(15-Benzyloxy-pentadécyl)-2,5,7,8-tétraméthyl-chroman-6-ol

5

0,11 g de triméthylhydroquinone (0,728 mmol ; 1 éq. ; PM = 152,19 g/mol) est dissous dans 3 mL d'acétate d'éthyle. 0,08 g de ZnCl<sub>2</sub> (0,728 mmol ; 0,8 éq. ; PM = 136, 29 g/mol) puis 0,01 mL de HCl concentré (0,145 mmol ; 0,2 éq. ; PM = 36,46 g/mol) sont ajoutés. Après 5 minutes à température ambiante, 0,28 g de 18-benzyloxy-3-méthyl-octadéc-1-èn-3-ol (0,728 mmol ; 1 éq. ; PM = 388,33 g/mol) dissous dans 4 mL d'acétate d'éthyle, est ajouté goutte à goutte. Une analyse par chromatographie en couche mince, montre que la réaction est terminée après 48 h. 100 mL d'une solution aqueuse saturée de NaHCO<sub>3</sub> sont ajoutés et la phase aqueuse est extraite à l'éther. Les phases organiques réunies sont séchées par du sulfate de magnésium et évaporées sous pression réduite pour donner un brut rouge. Le brut est chromatographié sur colonne de silice (4 x 15 cm, éluant 15 % d'acétate d'éthyle dans l'hexane). Au total, 0,29 g de 2-(15-benzyloxy-pentadécyl)-2,5,7,8-tétraméthyl-chroman-6-ol est récupéré, ce qui correspond à 0,554 mmol et à un rendement de 76 %.

20 R<sub>f</sub> = 0,74 ; éluant : 30 % d'acétate d'éthyle dans l'hexane

RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 1,22 (s, 3H, H-2a) ; 1,25 (s large, 24H, H-2' à H-13') ; 1,51-1,66 (m, 4H, H-1' et H-14') ; 1,70-1,86 (m, 2H, H-3) ; 2,11 (s, 6H, H-5a, H-7a) ; 2,16 (s, 3H, H-8a) ; 2,6 (t, 2H, J = 6,8 Hz, H-4) ; 3,46 (t, 2H, J = 6,6 Hz, H-15') ; 4,18 (s, 1H, phénoxy) ; 4,50 (s, 2H, H-16') ; 7,27-7,35 (m, 5H, H-2'' à H-6'')

25

RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 11,3 (CH<sub>3</sub>, C-5a) ; 11,8 (CH<sub>2</sub>, C-7a) ; 12,2 (CH<sub>3</sub>, C-8a) ; 20,7 (CH<sub>2</sub>, C-4) ; 23,6 (CH<sub>2</sub>, C-2') ; 23,8 (CH<sub>3</sub>, C-2a) ; 26,2 (CH<sub>3</sub>, C-3') ; 29,5-30,0 (11 x CH<sub>2</sub>, C-4' à C-14') ; 31,5 (CH<sub>2</sub>, C-3) ; 39,5 (CH<sub>2</sub>, C-1') ; 70,5 (CH<sub>2</sub>, C-15') ; 72,8 (Ph-CH<sub>2</sub>, C-16') ; 74,5 (C quaternaire, C-2) ; 117,3 (Ph, C-5) ; 118,4 (Ph, C-6) ; 121,0 (Ph, C-8) ; 122,6 (Ph, C-7) ; 127,4 (Ph, C-4'') ; 127,6 (Ph, C-2'' et C-6'') ; 128,3 (Ph, C-3'' et C-5'') ; 138,7 (Ph, C-1'') ; 144,5 (Ph, C-4a) ; 145,6 (Ph, C-8b)

30

## 6. Préparation de 2-(15-Hydroxy-pentadécyl)-2,5,7,8-tétraméthyl-chroman-6-ol

0,16 g de 2-(15-benzyloxy-pentadécyl)-2,5,7,8-tétraméthyl-chroman-6-ol (0,312 mmol ; 1  
 5 éq. ; PM = 522,52 g/mol) est dissous dans 8 mL d'éthanol. 0,3 g de Pd/C (5 %) (20 % en  
 masse) est ajouté sous argon puis l'argon est remplacé par du dihydrogène. En tout, 3  
 cycles vide-H<sub>2</sub> sont effectués. Une analyse par chromatographie sur couche mince montre  
 que l'hydrogénation est totale après 4 heures. La solution est filtrée sur célite et évaporée  
 sous pression réduite pour donner un brut blanc. Le brut est chromatographié sur colonne  
 10 de silice (3 x 15 cm, éluant 40 % d'acétate d'éthyle dans l'hexane). Au total, 0,13 g de 2-  
 (15-hydroxy-pentadécyl)-2,5,7,8-tétraméthyl-chroman-6-ol est récupéré, ce qui  
 correspond à 0,3 mmol et à un rendement de 96,4 %.

R<sub>f</sub> = 0,56 ; éluant : 30 % d'acétate d'éthyle dans l'hexane

15 RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 1,22 (s, 3H, H-2a) ; 1,25 (s large, 24H, H-2' à H-13') ;  
 1,51-1,61 (m, 4H, H-1' et H-14') ; 1,70-1,86 (m, 2H, H-3) ; 2,11 (s, 6H, H-5a, H-7a) ; 2,16  
 (s, 3H, H-8a) ; 2,6 (t, 2H, J = 6,8 Hz, H-4) ; 3,64 (t, 2H, J = 6,6 Hz, H-15') ; 4,24 (s, 1H,  
 phénoxy)

20 RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 11,3 (CH<sub>3</sub>, C-5a) ; 11,8 (CH<sub>2</sub>, C-7a) ; 12,2 (CH<sub>3</sub>, C-8a) ;  
 20,7 (CH<sub>2</sub>, C-4) ; 23,6 (CH<sub>2</sub>, C-2') ; 23,8 (CH<sub>3</sub>, C-2a) ; 26,2 (CH<sub>3</sub>, C-3') ; 29,5-30,0 (11 x  
 CH<sub>2</sub>, C-4' à C-14') ; 31,5 (CH<sub>2</sub>, C-3) ; 39,5 (CH<sub>2</sub>, C-1') ; 70,5 (CH<sub>2</sub>, C-15') ; 72,8 (Ph-  
 CH<sub>2</sub>, C-16') ; 74,5 (C quaternaire, C-2) ; 117,3 (Ph, C-5) ; 118,4 (Ph, C-6) ; 121,0 (Ph, C-  
 8) ; 122,6 (Ph, C-7) ; 144,5 (Ph, C-4a) ; 145,6 (Ph, C-8b)

25

Les composés dans lesquels R<sub>2</sub> est égal à un groupement méthoxy ou à un groupement  
 acétate, n est égal à 13 et m est égal à 1, ont été synthétisés de la même façon, R<sub>1</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> et  
 R<sub>5</sub> étant tels que définis précédemment dans le texte, en particulier méthyle. D'autres  
 composés où R<sub>1</sub>, R<sub>3</sub> ou R<sub>4</sub> représente un groupement hydroxyle, méthoxy ou acétate et les  
 30 autres substituants étant tels que définis précédemment dans le texte, en particulier  
 méthyle, ont également été synthétisés.

**B. Inhibition de l'activation de la microglie par les TFA (Tocopherol Fatty Alcohols dans lesquels  $R_1$ ,  $R_3$ ,  $R_4$  et  $R_5$  sont des groupes méthyle et  $R_2$  correspond à un groupe hydroxyle)**

5 Les expériences réalisées concernent la capacité de ces molécules à inhiber dans la microglie activée la libération de nitrites et de  $\text{TNF-}\alpha$ . Une autre expérience réalisée visait à étudier l'expression de la MHC II.

**1. Mesures de la libération de nitrites**

10

L'activité de la NO-synthase de type II (NOS II) représente un paramètre de l'activité microgliale souvent analysée dans la littérature. Cette enzyme est responsable de la synthèse du radical monoxyde d'azote en condition d'activation inflammatoire. La microglie au repos n'exprime que des taux à la limite de la détection par immunoblotting.

15 Une activation de 24 à 48 heures entraîne une forte augmentation de cette expression. Le produit de cette enzyme, le NO, se dégrade rapidement en culture pour former des nitrites. Un dosage, par colorimétrie (méthode de Griess), montre que les niveaux de  $\text{NO}_2^-$  suivent la même tendance.

Dans les expériences réalisées, les inventeurs ont mesuré, après 24 heures et 48 heures  
20 d'activation, les concentrations en  $\text{NO}_2^-$ , dans des cultures de cellules microgliales traitées avec 0.01  $\mu\text{g/ml}$  de LPS, en présence des produits TFA10, TFA12, TFA14, TFA16 et de la vitamine E à des concentrations de  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  et  $10^{-7}$  M.

Les résultats obtenus provenant, des trois expériences indépendantes, montrent que les alcools gras TFA10, TFA12, TFA14, TFA16, à des concentrations de  $10^{-5}$  M, entraînent  
25 une diminution dans les cellules de la production de nitrites de 50% par rapport aux valeurs contrôles. L'activité de ces produits est concentration dépendante puisqu'elle décroît avec la concentration. Les produits TFA12, TFA14, TFA16 semblent présenter une activité plus forte que le TFA10 à  $10^{-5}$  M. en revanche la vitamine E ne présente pas d'activité sur la production de nitrites.

30 Ces résultats montrent que les produits selon l'invention sont capables de réduire la production de nitrites des cellules microgliales activées par le LPS. Ces résultats montrent qu'il existe un rapport entre la longueur de chaîne de ces produits et leurs activités,

puisque le TFA10 (qui correspond à la plus petite chaîne) possède la plus faible activité de ces alcools gras tocophéroliques.

## 2. Mesure de la libération de TNF- $\alpha$

L'expression du TNF- $\alpha$  représente un paramètre de l'activation microgiale souvent analysée dans la littérature. La microglie au repos n'exprime pas cette cytokine. Une activation de 24 heures par le LPS entraîne une forte augmentation de l'expression, détectable par test Elisa.

Dans les expériences réalisées, les inventeurs ont mesuré après 24 heures d'activation, les concentrations en TNF- $\alpha$  dans des cultures de cellules microgiales traitées avec 0.01  $\mu\text{g/ml}$  de LPS en présence de TFA10, TFA12, TFA14, TFA16 et de vitamine E à des concentrations de  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  et  $10^{-7}$  M.

Les résultats obtenus concernant le TNF- $\alpha$  montrent que les alcools gras tocophéroliques TFA12, TFA14 et TFA16 à  $10^{-5}$  M entraînent une diminution dans les cellules de la production de TNF- $\alpha$  de 30 à 40% par rapport aux valeurs contrôles. L'activité de ces produits est concentration dépendante puisqu'elle décroît avec la concentration. Le produit TFA10 ne présente pas d'activité, tout comme la vitamine E.

Ces résultats préliminaires sur la production de TNF- $\alpha$  confirment les résultats obtenus avec les expériences concernant la production de nitrites. Les produits TFA12, TFA14 et TFA16 à  $10^{-5}$  M, inhibent la production de TNF- $\alpha$  de la microglie activée. En revanche le produit TFA10 et la vitamine E se révèlent inefficaces.

Par conséquent, ces résultats démontrent qu'il existe un rapport, au niveau des alcools gras tocophéroliques, entre la longueur de chaîne de ces produits et leurs activités.

## 3. Mesures de l'expression de la MHC II

En réponse à l'activation par l'interféron  $\gamma$  (INF- $\gamma$ ), de 15% à 20% des cellules microgiales expriment, après 72 heures, la MHC II. Cette expression représente un autre paramètre de l'activation microgiale. Pour mesurer cette expression, la technique de cytométrie de flux a été utilisée. Les cellules microgiales expriment la MHC II après 72 heures d'activation par INF- $\gamma$  (100 U/ml). Les cellules traitées avec les différents produits

à  $5 \times 10^{-6}$  M, sont marquées à la FITC. Une estimation quantitative est réalisée en utilisant un FACScan.

Les résultats obtenus dans trois expériences indépendantes, montrent que les alcools tocophéroliques TFA10, TFA12, TFA14, TFA16 et la vitamine E à  $5 \times 10^{-6}$  M n'entraînent

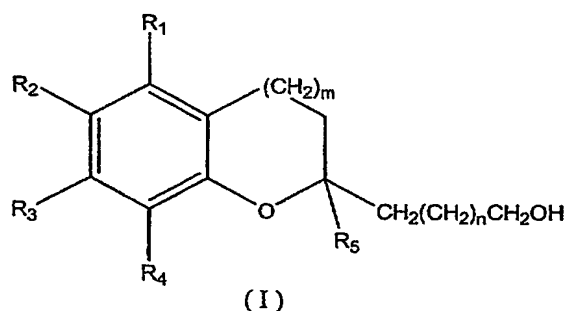
5 pas une diminution de l'expression de la MHC II dans les cellules microgliales.

Il semble donc que ces produits ne soient pas capables de bloquer la réponse induite par l'activation de la voie INF- $\gamma$ . L'activité de ces produits et la voie INF- $\gamma$  paraissent donc indépendantes.



## REVENDEICATIONS

1. Composés isolés ou synthétiques provoquant la différenciation de cellules précurseurs d'oligodendrocytes en cellules oligodendrogiales, et/ou réprimant in vivo l'activation des cellules microgliales.
2. Composés, caractérisés en ce qu'ils présentent la formule générale (I) suivante :

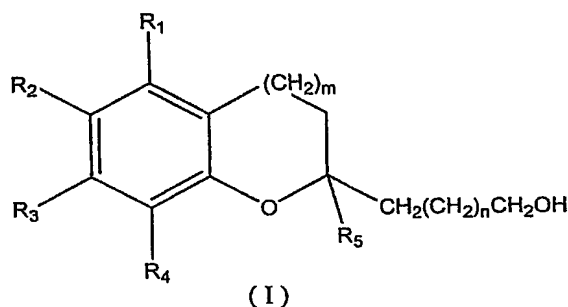


dans laquelle

- $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  et  $R_4$ , identiques ou différents, représentent un atome d'hydrogène, un groupe hydroxyle, un groupe ( $C_1$ - $C_6$ ) alkyle linéaire ou ramifié, un groupe ( $C_1$ - $C_6$ ) alkoxy linéaire ou ramifié, un groupe ( $C_1$ - $C_6$ ) carboxylate linéaire ou ramifié,
  - $R_5$  représente un atome d'hydrogène ou un groupe ( $C_1$ - $C_6$ ) alkyle linéaire ou ramifié,
  - $m$  est un nombre entier compris entre 0 et 2, et
  - $n$  est un nombre entier compris entre 8 et 25.
3. Composés selon la revendication 2, caractérisés en ce que  $n$  est un nombre entier compris entre 8 et 16.
  4. Composés selon l'une des revendications 2 ou 3, caractérisé en ce que  $R_5$  représente un atome d'hydrogène ou un radical méthyle.

## REVENDICATIONS

1. Composés isolés ou synthétiques provoquant la différenciation de cellules précurseurs d'oligodendrocytes en cellules oligodendrogiales, et/ou réprimant in vivo l'activation des cellules microgliales.
2. Composés selon la revendication 1, caractérisés en ce qu'ils présentent la formule générale (I) suivante :



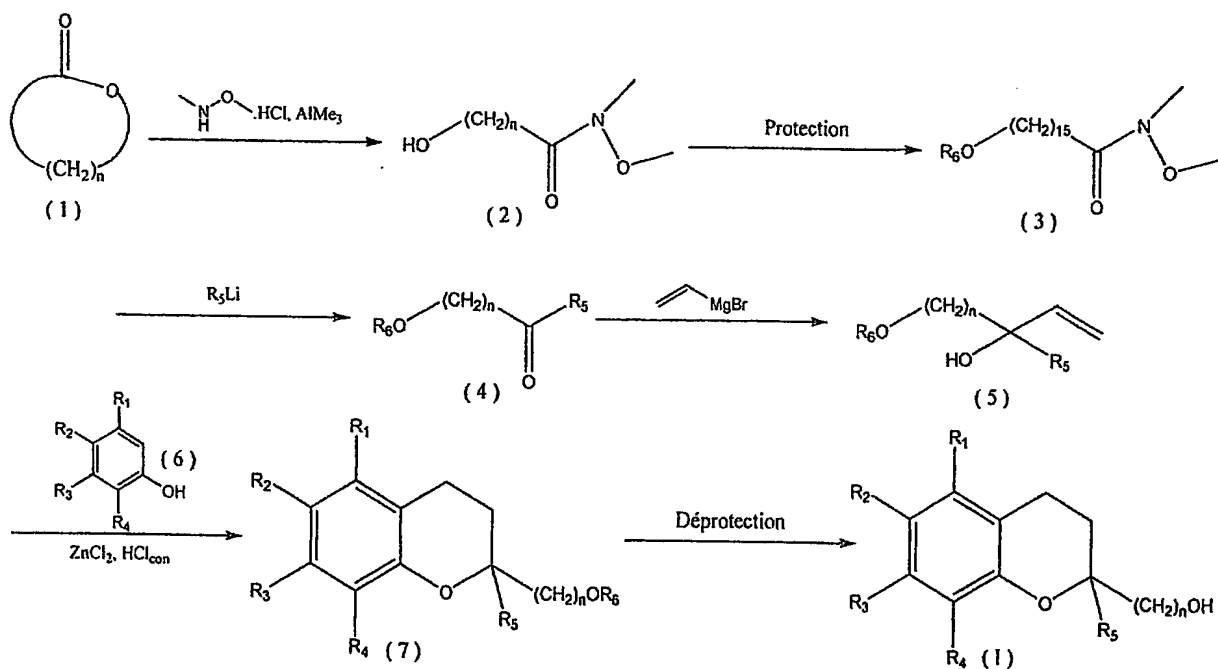
dans laquelle

- $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  et  $R_4$ , identiques ou différents, représentent un atome d'hydrogène, un groupe hydroxyle, un groupe ( $C_1$ - $C_6$ ) alkyle linéaire ou ramifié, un groupe ( $C_1$ - $C_6$ ) alkoxy linéaire ou ramifié, un groupe ( $C_1$ - $C_6$ ) carboxylate linéaire ou ramifié,
  - $R_5$  représente un atome d'hydrogène ou un groupe ( $C_1$ - $C_6$ ) alkyle linéaire ou ramifié,
  - $m$  est un nombre entier compris entre 0 et 2, et
  - $n$  est un nombre entier compris entre 8 et 25.
3. Composés selon la revendication 2, caractérisés en ce que  $n$  est un nombre entier compris entre 8 et 16.
  4. Composés selon l'une des revendications 2 ou 3, caractérisé en ce que  $R_5$  représente un atome d'hydrogène ou un radical méthyle.

5. Composés selon l'une des revendications 2 à 4, caractérisés en ce que l'atome de carbone portant le substituant  $R_5$  est de configuration R, S ou un mélange.
6. Composés de formule (I) selon l'une des revendications 2 à 5, caractérisés en ce que au moins un, de préférence un seul, des substituants présents sur le noyau aromatique,  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  et/ou  $R_4$  représente un groupe hydroxyle, alkoxy ou carboxylate.
7. Composés de formule (I) selon l'une des revendications 2 à 6, caractérisés en ce que le groupe ( $C_1-C_6$ ) alkyle linéaire ou ramifié est le radical méthyle, éthyle, isopropyle ou tertibutyle.
8. Composés de formule (I) selon l'une des revendications 2 à 6, caractérisés en ce que le groupe ( $C_1-C_6$ ) alkoxy linéaire ou ramifié est le groupe méthoxy, éthoxy, isopropoxy ou tert-butoxy.
9. Composition pharmaceutique comprenant à titre de substance active au moins un composé isolé ou synthétique provoquant la différenciation de cellules souches neurales et/ou de cellules précurseurs d'oligodendrocytes en cellules oligodendrogiales, ou la modulation de l'activation des cellules microgliales en association avec un véhicule acceptable sur le plan pharmaceutique.
10. Composition pharmaceutique selon la revendication 9, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un composé selon l'une des revendications 2 à 8.
11. Utilisation d'au moins un composé selon l'une quelconque des revendications précédentes 1-8 dans le cadre de la préparation d'une composition pharmaceutique destinée à la prévention ou au traitement des maladies du système nerveux altérant les oligodendrocytes ou leur activité et/ou de l'inflammation du système nerveux.
12. Utilisation d'au moins un composé selon l'une quelconque des revendications 1 à 8 dans le cadre de la préparation d'une composition pharmaceutique destinée à la prévention ou au traitement des maladies neurodégénératives.

5. Composés selon l'une des revendications 2 à 4, caractérisés en ce que l'atome de carbone portant le substituant  $R_5$  est de configuration R, S ou un mélange.
6. Composés de formule (I) selon l'une des revendications 2 à 5, caractérisés en ce que au moins un, de préférence un seul, des substituants présents sur le noyau aromatique,  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  et/ou  $R_4$  représente un groupe hydroxyle, alkoxy ou carboxylate.
7. Composés de formule (I) selon l'une des revendications 2 à 6, caractérisés en ce que le groupe ( $C_1$ - $C_6$ ) alkyle linéaire ou ramifié est le radical méthyle, éthyle, isopropyle ou tertibutyle.
8. Composés de formule (I) selon l'une des revendications 2 à 6, caractérisés en ce que le groupe ( $C_1$ - $C_6$ ) alkoxy linéaire ou ramifié est le groupe méthoxy, éthoxy, isopropoxy ou tert-butoxy.
9. Composition pharmaceutique comprenant à titre de substance active au moins un composé isolé ou synthétique selon l'une des revendications 1-8, provoquant la différenciation de cellules souches neurales et/ou de cellules précurseurs d'oligodendrocytes en cellules oligodendrogiales, ou la modulation de l'activation des cellules microgliales en association avec un véhicule acceptable sur le plan pharmaceutique.
10. Composition pharmaceutique selon la revendication 9, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un composé selon l'une des revendications 2 à 8.
11. Utilisation d'au moins un composé selon l'une quelconque des revendications précédentes 1-8 dans le cadre de la préparation d'une composition pharmaceutique destinée à la prévention ou au traitement des maladies du système nerveux altérant les oligodendrocytes ou leur activité et/ou de l'inflammation du système nerveux.
12. Utilisation d'au moins un composé selon l'une quelconque des revendications 1 à 8 dans le cadre de la préparation d'une composition pharmaceutique destinée à la prévention ou au traitement des maladies neurodégénératives.

13. Utilisation selon la revendication 11, caractérisée en ce que la composition pharmaceutique est destinée à la prévention ou au traitement des maladies démyélinisantes ou dysmyélinisantes.
14. Utilisation selon la revendication 11 ou 12, caractérisée en ce que la composition pharmaceutique prévient ou traite la sclérose en plaques, la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson ou la maladie de Creutzfeldt-Jakob.
15. Utilisation d'au moins un composé selon l'une quelconque des revendications précédentes 1-8 pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée à moduler, de préférence réprimer, *in vivo*, l'activation des cellules microgliales et/ou à différencier les cellules précurseurs d'oligodendrocytes.
16. Procédé de préparation d'un composé de formule (I) selon l'une des revendications 2 à 8, caractérisé en ce qu'il met en œuvre les étapes du schéma réactionnel suivant :



dans lequel :

- $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ ,  $R_4$ ,  $R_5$  et  $n$  ont la même signification que décrite dans la revendication 2 et
- $R_6$  représente un groupement benzyle ou un groupement *tert*-butyldiméthylsilyle

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

**DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S)** Page N° 1.. / 1..

(À fournir dans le cas où les demandeurs et les inventeurs ne sont pas les mêmes personnes)



Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 @ W / 270601

<b>Vos références pour ce dossier (facultatif)</b>		B0231FR
<b>N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL</b>		0311325
<b>TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)</b>		
Composés promoteurs de la différenciation des précurseurs d'oligodendrocytes et modulateurs de l'activation microgiale, compositions et utilisations.		
<b>LE(S) DEMANDEUR(S) :</b>		
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Université Louis Pasteur</li> <li>- Centre National de la Recherche Scientifique</li> <li>- Centre Universitaire de Luxembourg</li> </ul>		
<b>DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :</b>		
<input checked="" type="checkbox"/> 1	Nom	LUU
	Prénoms	Bang
Adresse	Rue	27 rue Kamm
	Code postal et ville	67000 Strasbourg
Société d'appartenance (facultatif)		
<input checked="" type="checkbox"/> 2	Nom	HEUSCHLING
	Prénoms	Paul
Adresse	Rue	8 rue Nic Arend
	Code postal et ville	18155 Garnich (Grand Duché de Luxembourg)
Société d'appartenance (facultatif)		
<input checked="" type="checkbox"/> 3	Nom	MULLER
	Prénoms	Thierry
Adresse	Rue	17 rue du Commerce
	Code postal et ville	19026 Ettelbruck (Grand Duché de Luxembourg)
Société d'appartenance (facultatif)		
S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suivi du nombre de pages.		
<b>DATE ET SIGNATURE(S)</b> <b>DU (DES) DEMANDEUR(S)</b> <b>OU DU MANDATAIRE</b> (Nom et qualité du signataire)		
Paris, le 26 septembre 2003 Béatrice TEZIER HERMAN CPI 00-10000		

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**